

Cara uji mikrobiologi-Bagian 3: Penentuan angka lempeng total (ALT) pada produk perikanan



© BSN 2006

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan	2
5 Media dan pereaksi	2
6 Kondisi	2
7 Preparasi contoh.....	2
8 Prosedur	3
9 Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri.....	4
10 Pelaporan.....	5
11 Keamanan dan keselamatan kerja	7
Lampiran A (normatif) Pembuatan media.....	8
Lampiran B (normatif) Pembuatan pereaksi	9
Lampiran A (informatif) Skema penentuan angka lempeng total (ALT).....	10
Bibliografi	11

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan komoditas ikan segar yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini menggantikan SNI 01-2339-1991 yang disusun oleh Panitia Teknis 65-05 Produk Perikanan dalam rangka perbaikan setelah lima tahun yang telah dirumuskan melalui rapat-rapat teknis, rapat konsensus pada tanggal 11 Oktober 2004 di Jakarta. Dihadiri oleh wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

- 1 Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 01/MEN/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 21/MEN/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan (POM) No.03725/B/SK/VII/89 tanggal 10 Juli 1989 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam dalam Makanan dan No.03726/B/SK/VII/89 tanggal 10 Juli 1989 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan.

Cara uji mikrobiologi-Bagian 3: Penentuan angka lempeng total (ALT) pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Metode penentuan angka lempeng total ini digunakan untuk menentukan jumlah total mikroorganisma *aerob* dan *anaerob* (psikofilik, mesofilik dan termofilik) pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1

angka lempeng total aerob

jumlah mikroorganisma hidup yang membutuhkan oksigen yang terdapat dalam suatu produk yang diuji

2.2

inkubasi

pengkondisian mikroorganisma untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

2.3

koloni

sel mikroba yang tumbuh pada media agar dan dapat dilihat secara visual

2.4

mikroorganisma

kelompok organisme yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat dibawah mikroskop

2.5

media agar

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme

2.6

produk perikanan

ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir yang berupa ikan segar, ikan beku dan bahan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

2.7

psikofilik

kelompok mikroorganisme yang hidup pada suhu kurang dari 20°C

2.8

mesofilik

kelompok mikroorganisme yang hidup pada suhu 20 °C-40°C

2.9

termofilik

kelompok mikroorganisme yang hidup pada suhu lebih besar dari 40°C.

3 Prinsip

Pertumbuhan mikroorganisme *aerob* dan *anaerob* (psikrofilik, mesofilik dan termofilik) setelah contoh diinkubasikan dalam media agar pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam 48 jam ± 1 jam mikroorganisme ditumbuhkan pada suatu media agar, maka mikroorganisma tersebut akan tumbuh dan berkembang biak dengan membentuk koloni yang dapat langsung dihitung.

Penentuan Angka Lempeng Total dapat dilakukan dengan dua cara. Pertama, metoda cawan agar tuang/*pour plate* yaitu dengan menanamkan contoh ke dalam cawan petri terlebih dahulu kemudian ditambahkan media agar. Kedua, metode cawan agar sebar/*spread plate* yaitu dengan menuangkan terlebih dahulu media agar ke dalam cawan petri kemudian contoh diratakan pada permukaan agar dengan menggunakan batang gelas bengkok.

4 Peralatan

- Timbangan dengan ketelitian 0,0001 g;
- Autoclave*;
- Inkubator $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Anaerobic jar*;
- Cawan petri 15 mm x 90 mm;
- Botol pengencer 20ml;
- Alat penghitung koloni;
- Blender beserta *Jar* yang dapat disterilisasi atau stomacher;
- Batang gelas bengkok diameter 3 mm–4 mm, dengan panjang tangkai 15 cm-20 cm;
- Pipet gelas atau pipetor : 0,1 ml, 1 ml, 5 ml dan 10 ml.

5 Media dan pereaksi

- Plate Count Agar*, sesuai lampiran A (normatif);
- Larutan *Butterfield's phosphate buffered*, sesuai lampiran B (normatif);
- Gas pack dan indikator air *anaerob*.

6 Kondisi

Pada metode cawan agar tuang, untuk menghindari berkurangnya populasi bakteri akibat panas yang berlebihan maka media agar yang akan dituang mempunyai suhu $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

7 Preparasi contoh

7.1 Berat contoh yang akan diuji diambil dengan ketentuan sebagai berikut:

- Contoh dengan berat lebih kecil dari 1 kg**
Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil-kecil hingga beratnya mencapai 100 g.

b) **Contoh dengan berat 1 kg–4,5 kg**

Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil kecil hingga beratnya mencapai 300 g.

c) **Contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg**

Dengan menerapkan teknik aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil kecil hingga beratnya mencapai 500 g.

7.2 Timbang contoh secara aseptik sebanyak 25 g untuk contoh dengan ketentuan a) dan b) dan 50 g untuk contoh dengan ketentuan c) diatas, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril. Untuk contoh 25 g tambahkan 225 ml larutan *butterfield's phosphate buffered* dan untuk contoh 50 g tambahkan 450 ml larutan *butterfield's phosphate buffered*, homogenkan selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran 10^{-1} . Dengan menggunakan pipet steril, ambil 1ml homogenat diatas dan masukkan ke dalam 9ml larutan *butterfield's phosphate buffered* untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} . Siapkan pengenceran selanjutnya (10^{-3}) dengan mengambil 1 ml contoh dari pengenceran 10^{-2} ke dalam 9 ml larutan *butterfield's phosphate buffered*. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali. Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dst sesuai kondisi contoh.

8 Prosedur

8.1 Metoda cawan agar tuang/*pour plate method*

- Pipet 1ml dari setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dst dan masukkan ke dalam cawan petri steril. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran.
- Tambahkan 12 ml - 15 ml PCA yang sudah didinginkan dalam *waterbath* hingga mencapai suhu $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan yang sudah berisi contoh. Supaya contoh dan media PCA tercampur sempurna lakukan pemutaran cawan ke depan ke belakang dan ke kiri-ke kanan.

CATATAN Untuk pengujian bakteri termofilik, penambahan media PCA kedalam cawan sebanyak 40 ml - 50 ml.

- Setelah agar menjadi padat, untuk penentuan mikroorganisme *aerob* inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator selama 48 jam ± 2 jam pada suhu $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (psikrofilik); 35°C (mesofilik); 45°C (termofilik).
- Untuk penentuan mikroorganisme *anaerob*, inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam *anaerobik jar* dan masukkan kedalam inkubator selama 48 jam ± 2 jam pada suhu $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (psikrofilik); 35°C (mesofilik); 45°C (termofilik).

9.2 Metoda cawan agar sebar /*spread plate method*

- Tuang 12 ml – 15 ml PCA ke dalam cawan-cawan petri steril dan dinginkan. Pipet 0,1 ml dari setiap pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , dst) ke dalam cawan petri yang telah berisi media PCA diatas dan ratakan dengan menggunakan batang gelas bengkok. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran.

CATATAN Untuk pengujian bakteri termofilik, media PCA yang dituang kedalam cawan sebanyak 40 ml - 50 ml.

- b) Setelah contoh meresap kedalam agar (diamkan sekurang-kurangnya 1 jam); Untuk penentuan mikroorganisme *aerob* inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 22°C \pm 1°C (psikrofilik); 35°C (mesofilik); 45°C (termofilik). Untuk penentuan mikroorganisme *anaerob*, inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam *anaerobik jar* dan masukkan kedalam inkubator selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 22°C \pm 1°C (psikrofilik); 35°C (mesofilik); 45°C (termofilik).
- c) Lakukan kontrol tanpa contoh dengan mencampur larutan pengencer dengan media PCA.

9 Pembacaan dan perhitungan koloni pada cawan petri

9.1 Cawan yang mengandung jumlah 25 koloni–250 koloni dan bebas spreader

Catat pengenceran yang digunakan dan hitung jumlah total koloni. Perhitungan Angka Lempeng Total sebagai berikut :

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

dengan :

N adalah jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per ml atau koloni per g;

$\sum C$ adalah jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung;

n_1 adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung.

CONTOH:

Pengenceran :	1:100	1:1000
Jumlah koloni :	232 dan 244	33 dan 28

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)] 10^{-2}} \\
 &= 537 / 0,022 \\
 &= 24.409 \\
 &= 24.000
 \end{aligned}$$

9.2 Cawan dengan jumlah koloni lebih besar dari 250

Bila jumlah koloni per cawan lebih besar dari 250 pada seluruh pengenceran maka laporkan hasilnya sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 250 laporkan sebagai perkiraan ALT.

CONTOH:

Pengenceran	: 1 : 100	1 : 1000
Jumlah koloni	: TBUD	640
Perkiraan ALT koloni per ml atau per g	: 640.000	

9.3 Spreader

Koloni *spreader* dibedakan menjadi 3 tipe :

- Rantai koloni, antara koloni saling menyambung yang disebabkan karena bakteri yang saling mengelompok
- Spreader* berasal dari lapisan air antara agar dan dasar cawan
- Spreader* berasal dari lapisan air pada sisi/pinggir cawan atau pada permukaan agar.

Jika cawan ditumbuhi *spreader* lebih besar dari 25% maka laporkan sebagai *spreader*:

- Spreader* tipe 1, jika hanya ada 1 rantai maka nyatakan sebagai 1 koloni.
 - Jika 1 atau lebih rantai terlihat berasal dari sumber yang berbeda, laporkan masing-masing sumber sebagai 1 koloni.
 - Spreader* tipe 2 dan 3 umumnya berasal dari koloni yang berbeda dan laporkan masing-masing sebagai 1 koloni.
- d) Jumlahkan *spreader* dan koloni untuk menghitung “Angka Lempeng Total”.

9.4 Jumlah koloni semua cawan kurang dari 25 koloni atau cawan tanpa koloni.

Bila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh koloni kurang dari 25, catat koloni yang ada, tetapi nyatakan perhitungan sebagai kurang dari 25 dan dikalikan dengan 1/d, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT.

CONTOH:

Pengenceran	: 1:100	1:1000
Jumlah koloni	: 18 dan 0	2 dan 0
Perkiraan ALT koloni per ml atau koloni per g	: lebih kecil dari 2.500	lebih kecil dari 2.500

10 Pelaporan

- Untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti, maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hasil pembulatan.
- Bulatkan keatas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi bila angka ketiga adalah 6, 7, 8 atau 9 dan gunakan angka 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya.
- Bulatkan ke bawah bila angka ketiga adalah 1, 2, 3 atau 4. Bila angka ketiga 5, bulatkan keatas bila angka kedua ganjil dan bulatkan kebawah bila angka kedua itu genap.

CONTOH:

Hasil perhitungan	ALT
12.700	13.000
12.400	12.000
15.500	16.000
14.500	14.000

- Beri tanda bintang (*) untuk cawan yang kurang dari 25 koloni.

CONTOH:

Pengenceran	: 1:100	1:1000
Jumlah koloni	: 18 dan 0	2 dan 0
Perkiraan ALT koloni per ml atau koloni per g	: lebih kecil dari 2.500*	lebih kecil dari 2.500*

- Jika seluruh cawan berisi *spreader* atau cawan terkontaminasi oleh sesuatu yang tidak diketahui, maka laporkan hasil sebagai 'Kegagalan dalam pengujian'.

Contoh perhitungan :

- 1 Cawan dengan jumlah koloni 25-250
Perhitungan Angka Lempeng Total sebagai berikut :

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

dengan :

N adalah jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per ml atau koloni per g;

$\sum C$ adalah jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung;;

n_1 adalah jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;

d adalah pengenceran pertama yang digunakan.

CONTOH:

Pengenceran	:	1:100	1:1000
Jumlah koloni	:	232 dan 244	33 dan 28

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)]10^{-2}} \\
 &= 537/0,022 \\
 &= 24.409 \\
 &= 24.000
 \end{aligned}$$

- 2 Seluruh cawan berisi *spreader* dan atau Kegagalan dalam pengujian. Laporkan hasil sebagai "*Spreader*" (SPR) atau kegagalan dalam pengujian
- 3 Seluruh cawan berisi lebih dari 100 koloni/cm². Perkiraan jumlah angka lempeng total adalah lebih besar dari (>) 100 dikalikan pengenceran tertinggi dan kalikan dengan luas cawan. Contoh dibawah berdasarkan pada penghitungan rata-rata 110/cm²

CONTOH:

			Perkiraan ALT/ml (g)
Pengenceran	:	1 : 100	1:1000
Jumlah koloni	:	tak hingga 7.150 ^a	lebih besar dari 6.500.000 ^b
		tak hingga 6.490 ^c	lebih besar dari 5.900.000

- ^a berdasarkan luas area 65 cm²
- Perkiraan jumlah ALT
- ^c berdasarkan luas area 59 cm²

CATATAN Untuk perhitungan koloni yang menggunakan metode cawan agar sebar/*spread plate*, jumlah koloni yang dihitung dikalikan dengan 10 dari pengenceran yang digunakan.

11 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- a) cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa;
- b) gunakan jas laboratorium selama melakukan analisa;
- c) lakukan setiap tahapan analisa secara aseptis;
- d) bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisa;
- e) bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan;
- f) media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang.



Lampiran A
(normatif)

Pembuatan media

Plate Count Agar

<i>Tryptone</i>	5 g
<i>Yeast extract</i>	22.5 g
<i>Dextrose</i>	1 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Aquades</i>	1 l

Panaskan seluruh bahan tersebut hingga mendidih. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Media tersedia secara komersial.



Lampiran B
(normatif)**Pembuatan pereaksi****Larutan *Butterfield's phosphate buffered*****Larutan stok:**

KH ₂ PO ₄	34 g
Aquades	500 ml

Atur pH 7.2 dengan 1 N NaOH. Tepatkan volume larutan tersebut hingga 1 liter dengan penambahan aquades. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Simpan dalam refrigerator.

Larutan kerja :

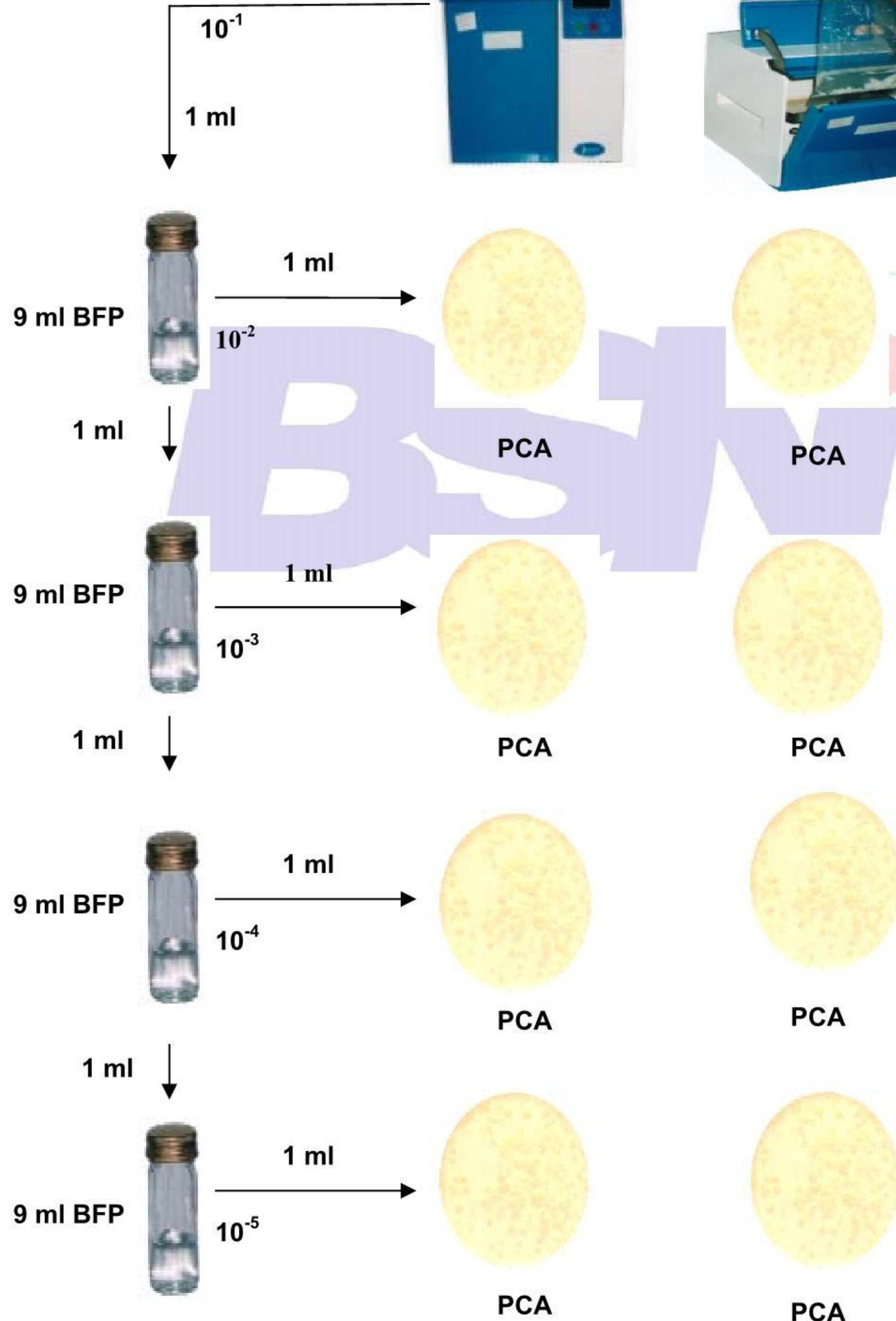
Pipet 10 ml larutan stok dan tepatkan hingga 1l dengan penambahan aquades. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C.



Lampiran C
(informatif)

Skema penentuan angka lempeng total (ALT)

PENGENCERAN



HOMOGENASI
25 gr contoh dalam 225 ml BFP

Inkubasi
35°C, 48 ± 2 jam

Hitung ALT

Bibliografi

Data verifikasi metoda pengujian Angka Lempeng Total (ALT) aerob. Laboratorium mikrobiologi BPPMHP, 2003.

Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, 1998. Chapter 3. AOAC International.













BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id